

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 200326055

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

水稻 *OsICK1* 基因克隆及其功能初探
Cloning and function analysis of rice
OsICK1 gene

何 艺 宾

指导教师姓名: 沈明山 教授

陈 亮 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2006 年 6 月 日

论文答辩日期: 2006 年 7 月 日

学位授予日期: 2006 年 月 日

答辩委员会主席: 王鸣刚 教授

评 阅 人: _____

2006 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成绩。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密 (), 在 年解密后适用本授权书。

2、不保密 (√)

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名:

日期: 年 月 日

导师签名:

日期: 年 月 日

目 录

中文摘要	1
英文摘要	3
略缩词	5
1 前言	6
1.1 细胞周期蛋白	6
1.1.1 细胞周期蛋白类型	6
1.1.2 有丝分裂型细胞周期蛋白	6
1.1.3 G1 型细胞周期蛋白	6
1.1.4 植物细胞周期蛋白	6
1.2 CDK 激酶	7
1.2.1 CDK 类型	7
1.2.2 CDK 结构与功能	7
1.2.3 植物 CDK	8
1.3 ICK	9
1.3.1 ICK 类型	9
1.3.2 植物 ICK 及研究进展	10
1.4 细胞周期及其调控	10
1.4.1 细胞周期	10
1.4.2 细胞周期调控机制	11
1.5 本文研究的目的和意义	13
2 材料与方法	14
2.1 材料	14
2.1.1 植物材料	14
2.1.2 菌株和质粒	14
2.1.3 主要化学试剂及仪器	14
2.1.3.1 主要化学试剂	14
2.1.3.2 主要仪器	15
2.2 方法	15
2.2.1 基因克隆	15
2.2.1.1 水稻总 RNA 的提取	15
2.2.1.2 RT-PCR 扩增	15
2.2.1.3 PCR 产物的纯化	16
2.2.1.4 DNA 连接反应	16
2.2.1.5 大肠杆菌感受态细胞的制备	16
2.2.1.6 连接产物转化感受态细胞	17
2.2.1.7 阳性克隆的筛选	17
2.2.1.8 PCR 产物测序	18
2.2.1.9 基因序列分析	18
2.2.2 植物过量表达载体构建	18
2.2.2.1 引物设计	18

2.2.2.2 <i>OsICK1</i> cDNA 的获得	18
2.2.2.3 载体构建	18
2.2.3 水稻遗传转化	21
2.2.3.1 水稻幼胚愈伤组织的诱导培养	21
2.2.3.2 农杆菌侵染液的制备	21
2.2.3.3 转化感染	22
2.2.3.4 预分化	22
2.2.3.5 分化及再生培养	22
2.2.4 <i>OsICK1</i> 基因的原核表达及其抗体制备	22
2.2.4.1 原核表达载体构建	22
2.2.4.2 诱导表达及蛋白的存在形式	22
2.2.4.3 目的表达蛋白的 MALDI-TOF-MS 分析	23
2.2.4.4 电洗脱回收目的蛋白	23
2.2.4.5 免疫小鼠	23
2.2.4.6 间接 ELISA 法检测抗血清效价	23
2.2.4.7 Western blotting 蛋白特异性分析	24
2.2.5 转基因水稻检测	25
2.2.5.1 酶组织化学法检测 GUS 基因的表达	25
2.2.5.2 转基因植株总 DNA 的提取与纯化	25
2.2.5.3 转基因植株的 PCR 检测	25
2.2.5.4 斑点杂交	26
2.2.5.5 Southern 杂交检测	27
2.2.5.6 实时荧光 PCR 检测 <i>OsICK1</i> 基因的转录水平	28
2.2.5.7 转基因水稻性状观察与分析	31
3 结果与分析	31
3.1 水稻 <i>OsICK1</i> 基因克隆和序列比对	31
3.2 植物过量表达载体构建	34
3.3 愈伤组织 GUS 基因表达检测和转基因再生小苗	36
3.4 <i>OsICK1</i> 基因的原核表达及其抗体制备	36
3.5 再生植株叶片和根的 GUS 基因表达检测	39
3.6 PCR 检测	40
3.7 斑点杂交检测	40
3.8 Southern 检测	41
3.9 转基因水稻性状观察	41
3.10 实时荧光 PCR 检测 <i>OsICK1</i> 基因的转录水平	42
4 讨论	43
4.1 水稻 <i>OsICK1</i> 基因克隆	43
4.2 水稻愈伤组织诱导及转化	44
4.3 实时荧光 PCR 检测	44
4.4 <i>OsICK1</i> 基因对水稻植株生长和发育的影响	45
4.5 <i>OsICK1</i> 基因的原核表达及抗体制备	45
4.6 工作展望	46

5 小结	46
参考文献	48
致谢	52
附录一：培养基及试剂的配制	53
附录二：测序报告	55

厦门大学博硕士论文摘要库

CONTENT

Abstract (In Chinese)	1
Abstract(In English)	3
Abbreviative Word	5
1 Introduction	6
1.1 Cyclin	6
1.1.1 Type of cyclin	6
1.1.2 Mitotic cyclin	6
1.1.3 G1 type cyclin	6
1.1.4 Plant cyclin	7
1.2 CDK	7
1.2.1 Type of CDK	7
1.2.3 Plant CDK	8
1.3 ICK	9
1.3.1 Type of ICK	9
1.3.2 Plant ICK and advancement	10
1.4 Cell cycle and control	10
1.4.1 Cell cycle	10
1.4.2 Cell cycle control	11
1.5 Study intention and significance	13
2 Materials and Methods	14
2.1 Materials	14
2.1.1 Plant material	14
2.1.2 Bacterium and plasmid	14
2.1.3 Reagents and instruments	14
2.1.3.1 Reagents	14
2.1.3.2 Instruments	15
2.2 Methods	15
2.2.1 Gene cloning	15
2.2.1.1 Rice total RNA extraction	15
2.2.1.2 RT-PCR reaction	15
2.2.1.3 Purification of PCR products	16
2.2.1.4 DNA Ligation reaction	16
2.2.1.5 E.coli <i>DH5a</i> Component cells preparation	16
2.2.1.6 Ligation products transformation	17
2.2.1.7 Positive clone selection	17
2.2.1.8 Sequencing of PCR products	18
2.2.1.9 Gene sequence analysis	18
2.2.2 Plant over-expression vector construction	18
2.2.2.1 Primer design	18
2.2.2.2 <i>OsICK1</i> cDNA obtained	18

2.2.2.3 Vector construction	18
2.2.3 Rice heredity transformation	21
2.2.3.1 Rice callus induce cultivate	21
2.2.3.2 <i>EHA105</i> infective solution preparation	21
2.2.3.3 Transform infection	22
2.2.3.4 Before differentiation	22
2.2.3.5 Differentiation and regeneration cultivate	22
2.2.4 <i>OsICK1</i> gene Prokaryotic expression and antibody preparation	22
2.2.4.1 Prokaryotic expression vector construction	22
2.2.4.2 Expression and presence form	22
2.2.4.3 MALDI-TOF-MS analysis	23
2.2.4.4 Protein recycle by electric washing	23
2.2.4.5 Mouse immunity	23
2.2.4.6 Antiserum effectivity measure	23
2.2.4.7 Western blotting analysis	24
2.2.5 Detection of transgenic plant	25
2.2.5.1 GUS gene expression detection	25
2.2.5.2 Total DNA extraction and purification	25
2.2.5.3 PCR detection	25
2.2.5.4 Southern blotting	26
2.2.5.5 Southern analysis	27
2.2.5.6 Transcription detection by real-time PCR	28
2.2.5.7 Character observation and analysis	31
3 Results and analysis	31
3.1 Cloning and sequencing of <i>OsICK1</i> gene	31
3.2 Plant overexpression vector construction	34
3.3 GUS gene expression detection and regeneration plant	36
3.4 Prokaryotic expression and antibody preparation	36
3.5 GUS gene expression detection of leafs and roots	39
3.6 PCR detection	40
3.7 Southern blotting detection	40
3.8 Southern analysis	41
3.9 Character observation of transgenic plant	41
3.10 Transcription detection of <i>OsICK1</i> gene	42
4 Discussion	43
4.1 Rice <i>OsICK1</i> gene cloning	43
4.2 Induction and transform of rice callus	44
4.3 Real-time PCR detection	44
4.4 <i>OsICK1</i> gene effect on plant development	45
4.5 Prokaryotic expression of <i>OsICK1</i> gene and antibody preparation	45
4.6 Work expectation	46

5 Brief Summary	46
Reference	48
Acknowledgment	52
Appendix one: culture medium and reagents	53
Appendix two: Sequence record	55

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

细胞分化是植物生长和发育的重要过程。在真核生物中,细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)是细胞周期调控的中心组分,对细胞周期起着核心性的调控作用。细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)能够与细胞周期蛋白(cyclin)结合,形成Cyclin-CDK复合物,激活CDK的激酶活性,使底物蛋白质磷酸化,调控细胞周期的运行。不同种类的CDK能够与不同种类的周期蛋白结合,构成不同的CDK激酶,在细胞周期的不同时期表现出活性,对细胞周期的不同时期进行调节。细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(ICK)在细胞周期进程中起着重要的负调控作用。ICK通过在细胞周期适当的时间点上抑制CDK的活性,从而对细胞周期进展起负调控作用。ICK能够与Cyclin-CDK复合物结合,抑制CDK的活性,使细胞周期进程被阻滞,失去增殖活性,从而影响到植物的生长和发育。因此,ICK对细胞周期的调控作用也越来越引起人们的关注。

本实验从水稻9311中获得一个水稻细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂基因,并命名为*OsICK1*。构建了*OsICK1*基因的植物过量表达载体,通过农杆菌介导法和水稻愈伤组织的遗传转化,使得该基因在水稻再生植株中过量表达,从而对该基因的功能进行初步研究。目前目的基因已成功转入粳稻品种中花11中,经组织化学染色、PCR检测和Southern分析检测确认获得的再生植株为转基因株系;实时荧光PCR检测了*OsICK1*基因在转基因植株中的转录水平,其中13号、14号、16号植株和9号、5号植株植株与对照植株比较,在表达水平上分别上调了1.29、1.14、1.23倍和1.31、1.08倍,并分别在植株高度和叶片形状出现了表型异常变化。13号、14号、16号植株的平均高度只有19.6 cm,为其它植株高度的1/3,9号、5号植株的叶片边缘呈现锯齿型,所以我们推测由于*OsICK1*基因的过量表达,影响水稻细胞周期的正常运行,从而导致植株矮小、叶片畸型的异常性状变化。主要实验结果如下:

- (1) 水稻 *OsICK1* 基因的获得:RT-PCR 扩增,从水稻 9311 中获得了一个水稻细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂基因,并命名为 *OsICK1*。测序结果表明该基因全长 585bp,编码 194 氨基酸。
- (2) *OsICK1* 基因植物过量表达载体构建:通过中间载体 pBPF, 获得了 P35s + *OsICK1* + Tnos 基因片段,插入植物双元表达载体 pCambia1301 中,获得了 *OsICK1* 基因植物过量表达载体并命名为 1301 + *OsICK1*。

- (3) 转基因株系的获得：获得 27 棵再生植株，检测到 24 棵为转基因株系。再生植株根和叶片经组织化学染色检测到 GUS 基因的表达，PCR、斑点杂交及 Southern 杂交证实了外源基因已整合到中花 11 基因组中。
- (4) 转录水平的检测：通过实时荧光 PCR 检测，获得了 5 株转录水平较高的转基因株系，初步获得了该基因可能的功能。
- (5) 制备了 *OsICK1* 蛋白的多克隆抗体，用于该蛋白表达水平的检测。

关键词：水稻；ICK 基因克隆；功能研究

Abstract

Cell division is one of the most important processes of plant growth and development. In eukaryotic species, the cyclin-dependent kinase (CDK) is the central component of the regulatory machinery controlling the progression of the cell cycle. The cyclin-dependent kinases (CDKs) are specific serine/threonine kinases that control progression through the cell cycle in all eukaryotes. The activity of CDKs and their substrate specificity depend on their association with cyclins and interaction with other proteins. The cyclin-CDK complexes regulate the cell cycle through the phosphorylation of down-stream substrates at key points of cell-cycle progression, i. e. the transitions from the G1 phase to the S phase and from G2 to mitosis. The cyclin-dependent kinase inhibitors (ICKs) plays a negative role in regulating the cell cycle of eukaryotic organisms including plants. CDK inhibitors are a group of low-molecular-weight proteins that have the ability to bind to cyclin-CDK complexes, thus affecting the activity of CDKs. So ICK can effect the processes of plant growth and development. And as a cell-cycle regulatory, We have been paying much attention to the fuctions of plant ICK.

In our research, We have obtained a rice ICK-like gene, and designated it as *OsICK1*. Then We constructed the plant expression vector of *OsICK1* gene. Through *Agrobacterium* mediation transformation system, We have successfully made *OsICK1* gene fused into the rice gene, and now analysis the functions of *OsICK1* gene. PCR, Southern dot blotting, Southern blotting and GUS detection have demonstrated that *OsICK1* gene have been successfully fused into the rice (zhong hua 11) genome. Results of Real-time PCR have showed that transcription level of *OsICK1* gene in five plants is higher than control one. overexpression of *OsICK1* gene can effect plant development. All the work was summarized as belows:

(1) Rice *OsICK1* gene obtained

By RT-PCR ,We obtained a ICK gene from rice 9311 and named *OsICK1*. Sequenced results show that full length of *OsICK1* gene is 585bp, encoding 194 amino acid.

(2) Overexpression vector construction

Through vector pBPF ,we obtained the gene segment of P35s+*OsICK1* +Tnos. Then the gene segment was inserted into plant expression vector pCAMBIA1301, and named 1301+*OsICK1*.

(3) Transformed plant obtained

We obtained 24 *OsICK1* gene transformed plants in 27 regenerated plants. PCR, Southern dot blotting, Southern blotting and GUS gene expression detections have demonstrated that *OsICK1* gene have been successfully fused into the rice (zhong hua A) genome.

(4) *OsICK1* gene transcription level detection

By Real-time PCR, We obtained 5 plants their *OsICK1* gene transcription level are higher than others.

(5) anti-*OsICK1* polyclonic antibody preparation

We have obtained the anti-*OsICK1* polyclonic antibody. It can be used to analysis *OsICK1* expression level in transgenic plant.

Key Words: rice, gene clone, function analysis

略 缩 词

CDK	细胞周期依赖性激酶
ICK	细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂
Cb(Carbenicillin Na ₂)	羧苄青霉素
Hyg(hygromycin B)	潮霉素 B
Kan(kanamycin)	卡那霉素
NAA(naphthalene acetic acid)	萘乙酸
2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)	2,4-二氯苯氧乙酸
6-BA (6-benzylaminopurine)	6-苄基氨基嘌呤
LB	Luria-Bertani 培养基
AS(3,5-dimethoxy-4-hydroxy acetophenone)	乙酰丁香酮
GUS (β -glucuronidase)	β -葡糖醛酸糖苷酶
CTAB (cetyltriethylammonium bromide)	十六烷基三甲基溴化铵
PCR (polymerase chain reaction)	聚合酶链式反应
X-gluc	5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-葡糖苷酸
BSA (bovine serum albumin)	牛血清白蛋白
BCIP	5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸二钠盐
NBT(nitro-blue tetrazolium)	氯化氮蓝四唑

1 前言

1.1 细胞周期蛋白^[1]

1.1.1 细胞周期蛋白类型

在哺乳动物和酵母细胞中已发现了多种细胞周期蛋白, 仅在脊椎动物中就已经发现了至少 8 种不同的细胞周期蛋白类型, 包括有丝分裂型 (A 和 B1~B3)、G1 型 (D1~D3、E 和 G) 和至少三种类型的细胞周期蛋白 (cycline-like protein) (C、F 和 H)^[2], 不同的细胞周期蛋白在基本特征、出现时期及其功能等方面有所不同。

1.1.2 有丝分裂型细胞周期蛋白

有丝分裂型细胞周期蛋白包括周期蛋白 A 和 B。周期蛋白 A 主要定位于核内, 它可以激活至少两种 CDK, 在 S 期起始阶段, 它可与 CDK2 结合, 在 DNA 合成的起始调控中发挥重要作用, 故又被称为 S 期细胞周期蛋白。在 S 期和 M 期, 核膜降解之前, 细胞周期蛋白 A 还可以与 P34^{cdc2} 结合成有激酶活性复合体^[3]。周期蛋白 B (又称 M 期细胞周期蛋白) 在间期时与 P34^{cdc2} 以非活性复合体形式存在于细胞质中, 但在 G2→M 时, 该复合体则以活性形式出现在核中^[4]。周期蛋白 B 在 S 期开始表达, 在 G2/M 时到达峰值, 中期向后期转换时被水解, 其表达和降解都稍晚于周期蛋白 A。

1.1.3 G1 型细胞周期蛋白

G1 型细胞周期蛋白虽然也同样具有周期蛋白框, 但是该保守区位于其 N 端, 且该类周期蛋白一般没有降解框, 而是在其 C 端有脯氨酸、谷氨酸和苏氨酸构成的 PEST 序列, 该序列与其不稳定有关。G1 型周期蛋白在 G1 期表达, 进入 S 期降低。另外其中的 D 型周期蛋白的 N 端有一个 LxCxE 的保守序列 (x 可以为任一氨基酸), 该保守序列直接参与了 D 型周期蛋白与 pRBE 及其相关蛋白的结合。二者形成的多聚复合物可引导细胞进入 G1 期。在芽殖酵母中 G1 基因包括 CLN1、CLN2、CLN3、HSC26 和 OORFD。在高等真核生物中也已发现了 C、D (D1、D2 和 D3) 以及 E 型。

1.1.4 植物细胞周期蛋白

目前认为植物中至少存在四种不同类型的细胞周期蛋白 (A、B、D 和 H), 其中研究较多的是 A 型^[5]、B 型和 D 型^[6]。在植物中已经克隆了很多有丝分

裂周期蛋白的 cDNA^[2]。根据其序列相似性, 又将 A 型和周期蛋白 B 细分为 CycA1~3 和 CycB1~2。1996 年, 有人发现拟南芥中, 两种周期蛋白基因的表达可以调控根的生长和发育。Umeda 等人^[2]最近在水稻中分离了两个有丝分裂周期蛋白的全长 cDNA, 并命名其编码的周期蛋白为 CyA1:os:1 和 CyB2:os:1, 可能与特异的 G2/M 期 CDK 形成复合物。Sorrell^[7]等从烟草中分离到三种 D 型 cyclin 的 cDNAs 并分别命名, 其中 Nicta; CycD3; 1 和 Nicta; CycD3; 2 属于 CycD3 型, Nicta;CycD2; 1 属于 CycD2 型。

1.2 CDK 激酶

CDKs 是一类含特征性丝氨酸/苏氨酸的激酶, 在所有真核细胞中控制细胞周期的整个进程。CDKs 的活性既受与之相结合的周期因子调节亚基的调节, 又与特异的磷酸化去磷酸化反应有关。CDKs 含有特异性的结构域, 其中有周期因子和 ATP 结合区以及保守的磷酸化调控位点^[8]。

1.2.1 CDK 类型

第一个 CDK 激酶是在酵母中发现的, 在裂殖酵母 (*Schizosaccharomyes pombe*) 中最先被确定具有依赖于周期蛋白激酶作用的催化亚基是 *cdc2* 基因的产物, 在芽殖酵母 (*Saccharomyce cerevisiae*) 中则是 *cdc28* 基因编码的产物^[9, 10]。在这两种酵母中, 这两个基因突变体的互补显示它们具有相同功能。序列分析结果显示它们之间具有 69% 的同源性, 都编码一种约 34kDa 的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 因而被统称为 P34^{cdc2}。自从酵母中的 *cdc2*, *cdc28* 以及动物中的 *cdc28* 同源物被鉴定为 CDK 后, 根据这些的共有结构序列, 通过差异显示, PCR 扩增等技术路线, 先后从动物及人体系统中克隆了多种类型的与 *cdc2* 相关的 cDNA, 并对其编码的蛋白质与细胞周期蛋白结合的活性进行了功能分析。鉴于它们的结构相似性和与不同的细胞周期蛋白结合调控细胞周期的共同性, 它们被统称为周期蛋白的蛋白激酶家族^[11]。目前已经发现并命名的 CDK 激酶包括 Cdc2、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK8 等。

1.2.2 CDK 结构与功能

CDK 是一类重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 主要生物学作用是启动 DNA 的复制和诱发细胞的有丝分裂。与其他蛋白激酶一样, CDK 也包含了保守的蛋白激酶结构域并在第三个结构域中, 都含有与最初在裂殖酵母中的 P34^{cdc2} 中发现

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库